

10/509,420

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

24 SEP 2004

PCT/JP2002/012392



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PH-1611-PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP02/12392	International filing date (day/month/year) 27 November 2002 (27.11.02)	Priority date (day/month/year) 27 March 2002 (27.03.02)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/29, 5/14, A01N 25/00, A01H 5/00		
Applicant JAPAN AS REPRESENTED BY PRESIDENT OF THE UNIVERSITY OF TSUKUBA		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of            sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 27 March 2003 (27.03.03)	Date of completion of this report 05 August 2003 (05.08.2003)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP02/12392

## I. Basis of the report

### 1. With regard to the elements of the international application:\*

☒ the international application as originally filed

☐ the description:

pages \_\_\_\_\_, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

☐ the claims:

pages \_\_\_\_\_, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

☐ the drawings:

pages \_\_\_\_\_, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

☐ the sequence listing part of the description:

pages \_\_\_\_\_, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

### 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).

☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).

☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

### 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

☐ contained in the international application in written form.

☒ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

### 4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages \_\_\_\_\_

☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_

☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

### 5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International Application No.

PCT/JP 02/12392

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	2-8	YES
	Claims	1	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-8	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-8	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

Document 1: WO 00/06754 A2 (Centrum voor Planten-veredekings-en Reproductieonderzoek), 10 February 2000

Document 2: WO 00/06753 A1 (Centrum voor Planten-veredekings-en Reproductieonderzoek), 10 February 2000

Document 3: E. A. van der Vossen et al., Plant J. (2000), Vol. 23, No. 5, pp. 567-576

Document 4: A. Bendahmane et al., Plant Cell (1999), Vol. 11, No. 5, pp. 781-792

Document 5: WO 99/54490 A2 (Plant Bioscience Limited), 28 October 1999

Document 6: WO 01/29239 A2 (Plant Bioscience Limited), 26 April 2001

#### Claim 1

The invention set forth in claim 1 is not novel over documents 1-3, cited in the international search report.

Documents 1-3 disclose a nmatode resistance gene isolated from potato, which shows 78% homology with the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 in the present application.

## Claim 1

The invention set forth in claim 1 is not novel over documents 4-6, cited in the international search report.

Documents 4-6 disclose a virus resistance gene which shows 78% homology with the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 in the present application.

## Claims 2-8

The inventions set forth in claims 2-8 do not involve an inventive step in the light of documents 1-3.

At the priority date of the present application, incorporation of known DNA into a vector, transformation of host cells by incorporation of this vector and production of genetically modified plants were well known techniques in this technical field; therefore, a person skilled in the art could easily construct a vector with a nematode resistance gene disclosed in documents 1-3 introduced, and transform plant host cells with said vector.

## PATENT COOPERATION TREATY

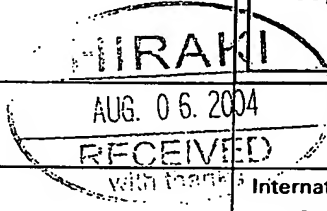
PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

HIRAKI, Yusuke  
Toranomon No.5 Mori Building Third  
Floor  
17-1, Toranomon 1-chome  
Minato-ku, Tokyo 105-0001  
Japan

Date of mailing (day/month/year) 29 July 2004 (29.07.2004)			IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference PH-1611-PCT			
International application No. PCT/JP2002/012392	International filing date (day/month/year) 27 November 2002 (27.11.2002)		

1. The following indications appeared on record concerning:			
<input checked="" type="checkbox"/> the applicant	<input type="checkbox"/> the inventor	<input type="checkbox"/> the agent	<input type="checkbox"/> the common representative
Name and Address JAPAN AS REPRESENTED BY PRESIDENT OF THE UNIVERSITY OF TSUKUBA 1-1-1, Tennodai Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8577 Japan		State of Nationality JP	State of Residence JP
		Telephone No.	
		Facsimile No.	
		Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:			
<input checked="" type="checkbox"/> the person	<input type="checkbox"/> the name	<input type="checkbox"/> the address	<input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence
Name and Address UNIVERSITY OF TSUKUBA 1-1-1, Tennodai Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8577 Japan		State of Nationality JP	State of Residence JP
		Telephone No.	
		Facsimile No.	
		Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:			
4. A copy of this notification has been sent to:			
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned		
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned		
<input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Akiko KOYAMA (Fax 338 7010)
Facsimile No. (41-22) 338.70.10	Telephone No. (41-22) 338 8023

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 10 月 2 日 (02.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/080838 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/29, (WATANABE, Kazuo) [JP/JP]; 〒300-2612 茨城県 つくば市 大砂字大久保 247-46 Ibaraki (JP). 渡邊 純子 (WATANABE, Junko) [JP/JP]; 〒300-2612 茨城県 つくば市 大砂字大久保 247-46 Ibaraki (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/12392
- (22) 国際出願日: 2002 年 11 月 27 日 (27.11.2002) (74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都 港区 虎ノ門一丁目 17 番 1 号 虎ノ門 5 森ビル 3 階 Tokyo (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, IN, JP, US.
- (30) 優先権データ: 特願 2002-089622 2002 年 3 月 27 日 (27.03.2002) JP (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 筑波大学 長が代表する日本国 (JAPAN AS REPRESENTED BY PRESIDENT OF THE UNIVERSITY OF TSUKUBA) [JP/JP]; 〒305-8577 茨城県 つくば市 天王台一丁目 1 番地の 1 Ibaraki (JP).
- (72) 発明者; および 添付公開書類:  
(75) 発明者/出願人 (米国について) 渡邊 和男 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL MELOIDOGYNE-RESISTANCE GENE AND UTILIZATION THEREOF

(54) 発明の名称: 新規ネコブセンチュウ抵抗性遺伝子とその利用

(57) Abstract: An excellent Meloidogyne-resistance gene and a method of using this gene. Namely, a novel Meloidogyne-resistance gene having qualitative resistance which shows no high-temperature sensitivity and is widely applicable to various species and strains of Meloidogyne; and Meloidogyne-resistant recombinant plants carrying the gene transferred thereinto.

(57) 要約: 本発明は、優れたネコブセンチュウ抵抗性遺伝子と、該遺伝子の利用方法に関する。すなわち、高温感受性がなく、幅広い種や系統のネコブセンチュウに対応可能な、量的抵抗性を有する新規ネコブセンチュウ抵抗性遺伝子と、該遺伝子を導入したネコブセンチュウ抵抗性組換え植物に関する。

WO 03/080838 A1

## 明 細 書

## 新規ネコブセンチュウ抵抗性遺伝子とその利用

5 技 術 分 野

本発明は、新規ネコブセンチュウ抵抗性遺伝子に関する。より詳細には、高温感受性がなく、幅広い種や系統のネコブセンチュウに対応可能な、量的抵抗性を有する新規ネコブセンチュウ抵抗性遺伝子と、該遺伝子の利用方法に関する。

10

背 景 技 術

センチュウは大きな門を構成する動物体で、植物や動物に寄生する 1 種  
の害虫である。植物に寄生するネコブセンチュウは、一般に体長 1 mm 以下  
であるが、植物細胞の原形質から栄養をとり、その被害は全世界で年間約  
15 10 億ドルにも達する。ネコブセンチュウのうち、メロイドジーネ  
(Meloidogyne) 属に属するもの(英名ルート・ノット・ネマトード: root knot  
nematode) は、現在約 70 種が確認されている。これらは、全ての作物及び  
多くの雑草に寄生するため、2000 種を超える植物種に影響を与えると報告  
されており、その中にはサツマイモやトマト、ジャカイモも含まれる。

20 ネコブセンチュウに感染しても、地上部分では、感染初期に寄生の判別  
に有効なはっきりとした兆候は見られないが、地下ではコブ (gall 或いは  
knot) が形成され始める。このコブの大きさは種や品種により異なり、多  
くの場合 1-2mm 程度であるため、肉眼では確認しにくい場合もあるが、コ  
ブの表面や根に産卵される卵の固まりは肉眼でも確認できる。最も顕著な  
25 兆候は、根や塊茎にあらわれる縦状の亀裂で、感染した根や塊茎中には様々

な発達段階のセンチュウが寄生する。ネコブセンチュウの感染は収量を減少させるだけでなく、寄生した根や塊茎の市場価値を激減或いは喪失させる。また、根や塊茎の亀裂は、別の病原生物の攻撃を容易にし、複合感染の可能性を増大させる (Hooker, W. J., Compendium of Potato Diseases, 5 p97-98, 1981, The American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota, USA; Jansson & Raman, Sweet Potato Pest Management, pp1-12, 1991, Wsetview Press, Boulder, Colorado, USA; Jones et al. Compendium of Tomato Diseases, pp49-50, 1991, APS PRESS, St. Paul, Minnesota, USA)。

ジャガイモに寄生するメロイドジネ属のセンチュウは、メロイドジネ  
10 ネ アレナリア チトウッド (*Meloidogyne arenaria* Chitwood)、メロイド  
ジネ インコグニータ チトウッド (*M. incognita* Chitwood)、メロイド  
ジネ ハプラ チトウッド (*M. hapla* Chitwood)、メロイドジネ ジャバ  
ニカ チトウッド (*M. javanica* Chitwood) の4種である。このうち、  
メロイドジネ・インコグニータは、世界中のジャガイモ圃場において、最も  
15 頻繁に発生するセンチュウである (Hooker, W. J., Compendium of Potato  
Diseases, p97-98, 1981, The American Phytopathological Society, St.  
Paul Minnesota, USA)。日本でも、暖かい九州のジャガイモ栽培地域で発  
症がみられ、作物の抵抗性付与や総合防除法の開発が望まれている。

ジャガイモにおけるネコブセンチュウの制御としては、古くから輪作に  
20 よる方法が行なわれてきた。この方法は、センチュウの集団密度を低下さ  
せるという点では有効な方法であるが、雑食性のネコブセンチュウでは輪  
作のサイクルに限界があるため、輪作のみでネコブセンチュウを制御する  
ことは難しい。一方、有機肥料を加えて、アンモニア系窒素の働きでネコ  
ブセンチュウの集団密度を押さえることもできる。この方法は、現在もア  
25 フリカ、アジア、中南米で実施されているが、ネコブセンチュウに対する



決定的な防御法ではない。他方、速攻性という点では、ジクロロプロペン (dichloropropene) や臭化メチル (methylbromide) 等による土壌燻蒸が最も優れているが、生態系あるいは作業者への悪影響という問題がある。

昨今、ホストであるジャガイモ自身のセンチュウ抵抗性を高める方法が  
5 試みられ、種々の抵抗性を有する育種系統が作出されている (Watanabe et al. Amer. Potato J. 71: 599-604, 1994; Watanabe et al. Breeding Science 45:341-347, 1995; Watanabe et al. Breeding Science 46: 329-336, 1996; Watanabe et al. Breeding Science 49: 53-61, 1999; Watanabe & Watanabe Plant Biotechnology 17:1-16, 2000)。しかし、センチュウのうち、メロ  
10 イドジーネ・インコグニータに対して高い抵抗性を持つジャガイモは、未だ作出されていない。

ところで、ネコブセンチュウ抵抗性を有する 2n 倍体野生近縁種から栽培ジャガイモへの抵抗性付与も試みられている。野生近縁種には、ネコブセンチュウ抵抗性遺伝子 (Rmi) が存在し、この遺伝子は相加的効果のある量的抵抗性を有することが、表現型の遺伝解析や育種経験からわか  
15 っている (Iwanaga et al., J. Amer. J. Hort Sci., 114 (6): 1008-1113 (1989); Watanabe et al. Breeding Sci., 46: 323-369 (1996); Watanabe et al., Breeding Sci., 49: 53-61 (1999) )。また、上記文献には、この Rmi 遺伝子によって誘導される抵抗性は、温度に対する感受性  
20 がなく高温でも有効であることも報告されている。しかしながら、この Rmi はいまだ単離されておらず、その配列もわかっていない。また、栽培ジャガイモは同質 4 倍体であるため遺伝様式が複雑で、有用な抵抗性品種の育種は実現していない。

ネコブセンチュウ属に対する抵抗性遺伝子群は、現在のところトマト及  
25 びジャガイモにおいてのみ、いくつかの遺伝地図上の位置が確認されてい

- る。例えば、トマトにおいては、メロイドジーン インコグニータ チトウッド、メロイドジーン ジャパニカ チトウッド、及びメロイドジーン アレナリア チトウッドに対する *Licopersicon. peruvianum* 由来抵抗性遺伝子 Mi が、染色体 6 番上 (Messeguer et al., Theor. Appl. Genet., 82: 529-536, 1991; Ho et al., Plant J., 2: 971-982, 1992) に座上がることが報告されている。また、メロイドジーン インコグニータ チトウッド及びメロイドジーン ジャパニカ チトウッドに対する *L. peruvianum* 由来抵抗性遺伝子 Mi3 が染色体 12 番上 (Yaghoobi et al., Theor. Appl. Genet., 91: 457-464, 1995) に座上がることが報告されている。Mi 遺伝子は、Williamson
- 10 らのグループにより単離され、その構造も明らかにされている (Rossi et al., Proc Natl Acad. Sci, 95: 9750-9754, 1998; Milligan et al., Plant Cell, 10: 1307-1319, 1998)。しかし、Mi 遺伝子は高温感受性であるため、感染初期の 24～48 時間高温露出されると、抵抗性が機能しなくなるという問題がある。
- 15 ジャガイモについては、メロイドジーン チトウデいの、レース 1 に対する Rmc1 遺伝子座が *S. bulbocastanum* (ソラナムバルボカスタナム) の染色体 1 1 番に座上がっていることが報告されている (Brown et al., Theor Appl. Genet., 92: 572-576, 1996)。また、メロイドジーン・インコグニータ・チトウッドに対する抵抗性の伝達について、1) 二つ以上の遺伝子
- 20 が抵抗性に関与している可能性 (Gomez et al., Amer. Potato J., 60: 353-360, 1983)、及び 2) 細胞質が抵抗性の発現に関与している可能性 (Gomez et al., Amer. Potato J., 60: 353-360, 1983, Iwanaga et al., J. Amer. Hort. Sci., 114: 1108-1013, 1989,) が指摘されている。さらに、メロイドジーン インコグニータ チトウッドに対する抵抗性は 5-6 の抵抗性遺伝子に支配される相加的な量的抵抗性であることがわかってきてい
- 25

る (Watanabe et al., Breed. Sci., 9: 53-61, 1999; Watanabe et al. submitted)。

- 一般に、植物の病原体 (pathogen) に対する強度の抵抗性は、非常に特異性 (specificity) が高い場合が多い。フローが提唱した遺伝子対遺伝子説 (gene for gene hypothesis) (Flow, Ann Rev. Phytopathol., 9: 275-296, 1971) は、このような高い特異的抵抗性を、植物の抵抗性遺伝子 (resistance gene) と病原体の非病原性遺伝子 (avirulence gene) の相互作用から説明する。そして、遺伝子対遺伝子の分子認識機構としては、リガンド レセプターモデルが一般に仮定されている (Gabriel & Rolfe, Ann. Rev. Phytopathol. 28: 365-391, 1990)。

- 単離された抵抗性遺伝子は、現在までに遺伝子産物の機能や構造の類似点から、5つのグループに整理されている (Baker et al., Science, 276: 1997; Bergelson et al. Science 292: 2281-2285, 2001; Dangl and Jones, Nature 411: 826-833, 2001)。このうち、クラス I に分類される抵抗性遺伝子は、ヌクレオチド結合領域 (Nucleotide binding site: NBS) 及びロイシン反復領域 (leucine rich repeat: LRR) を有し、これらの領域が抵抗性発現のシグナル伝達に関与していることが予想されている。クラス I に属する単離された遺伝子には、タバコの tobacco mosaic virus に対する N (Whitham et al., Cell, 78: 1101-1105, 1994)、アマの *Melampsora linin* に対する L6 (Lawrence et al., Plant Cell, 7: 1195-1206, 1995) 及び M (Anderson et al., Plant Cell, 9: 641-651, 1997)、シロイヌナズナの *Persomospora parasitica* に対する RPP5 (Bent, Plant Cell, 8: 1757-1771, 1996)、*Pseudomonas syringae* に対する RPS2 (Bent et al., Science 265: 1856-1860, 1993; Mindrinos et al., Cell, 78: 1089-1099, 1994) 及び、RPM1 (Grant et al., Science, 269: 843-846, 1995)、トマ

トの *Pseudomonas syringae* に対する PRF (Salmeron et al., Cell, 86: 123-133, 1996) 及び *Fusarium oxysporum* に対する I2C-1 (Ori et al., Plant Cell, 9: 521-531, 1997) 等が含まれる。さらに、前述のトマトにおける *L. peruvianum* 由来のネコブセンチュウ抵抗性遺伝子 Mi も、NBS 及び LRR  
5 を有する遺伝子であることが明らかにされている (Milligan et al., Plant Cell, 10: 1307-1319, 1998)。

クラス I に属するタンパク質は、C 末端側に不完全な LRR をもち、N 末端側に NBS をもっている。NBS は ATPase 及び GTPase 等に見られるタイプで、P ループを含む 3 つのモチーフから構成されている (Traut, Eur J.  
10 Biochem., 229: 9-19, 1994)。一般に、最初のキナーゼ 1a ドメインは、リン酸結合ループを形成し、その下流にはキナーゼ 2 ドメインが存在する。このキナーゼ 2 ドメイン中の固定したアスパラギン酸は、リン酸の移行反応に必要な金属結合部位を調整していると予想されている。さらに下流に位置するキナーゼ 3a ドメインは、ATP のプリンとしばしば相互作用するチロシン又はアルギニン  
15 を有する (Traut, Eur J. Biochem., 229: 9-19, 1994)。これらの NBS の存在は、抵抗性機能にキナーゼ活性或いは G タンパク質が重要な役割をもつことを示唆している (Hammond-Kosack & Jones, 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48: 575-607, 1997)。

一方、LRR ドメインは様々なタンパク質に見られ、イースト、ショウジョウバエ、ヒト等の種においては、多くの場合タンパク質-タンパク質相互作用に関わるものと考えられている (Kobe & Deisenhofer, Nature, 366: 751-756, 1993)。しかし、植物病害虫抵抗性においては、LRR ドメインは、非病原性 (Avr) 遺伝子により産出されたりリガンド結合ドメインとして機能したり、抵抗性 (R) 遺伝子の産物と、防御シグナル伝達に係る他のタンパク質との相互作用を容易にするものではないかと推測されている  
25

(Bent, Plant Cell, 8: 1757-1771, 1996)。

ところで、ジャガイモは世界の主要作物であり、アメリカ合衆国や日本等の先進国における多投資型 (high input) から、アフリカ、アジア、ラテンアメリカの発展途上国における低投資型 (low input) 農業までの幅広い生産体制に対応する優れた作物である。主食や野菜、スナックとしての食用のみでなく、飼料や工業用澱粉及び醗酵材料としても世界中で広く栽培されている (Harris, P. M. The Potato Crop, Chapman and Hall, London, 1978; International Potato Center <http://www.cgiar.org.cip/> 2001)。

特に発展途上国においては、生産量及び熱量供給の両面から、最も重要な作物の一つである。爆発的な人口の増大が進行するこれらの国々において、貴重な食糧源として、今後ますますジャガイモの生産量及び生産性の向上が期待されている。

一方、ジャガイモの生産量の多くは病害虫によるものであり、その中でもネコブセンチュウによる被害は、熱帯、亜熱帯から温帯に渡る広い地域に及ぶ深刻なものである (Hooker, W. J., Compendium of Potato Diseases, p97-98, 1981, The American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota, USA)。

しかしながら、ネコブセンチュウによる被害に対する決定的な解決策はなく、抵抗性遺伝子の機能や構造についての解明が待ち望まれていた。

## 発 明 の 開 示

本発明は、様々なネコブセンチュウに幅広く対応できる、優れたネコブセンチュウ抵抗性遺伝子を見出し、深刻なネコブセンチュウ被害に対する解決策を提供することを課題とする。

本発明者らは、2倍性ジャガイモ系統を対象として、植物抵抗性遺伝子

群に共通なNBSやLRRなどの配列情報を基に探索を行った結果、従来にない優れたネコブセンチュウ抵抗性を有する新規遺伝子の単離に成功した。そして、該遺伝子を利用することにより、優れたネコブセンチュウ抵抗性組換え植物の作出に成功し、本発明を完成するに至った。

5 すなわち、本発明は、以下の(1)～(8)に関する。

(1) 以下の(a)又は(b)のDNAからなる遺伝子。

(a) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNA。

(b) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ宿主にネ  
10 コブセンチュウ抵抗性を付与するDNA。

(2) 前記ネコブセンチュウ抵抗性が、遺伝子のコピー数に応じて抵抗性が増す量的抵抗性であることを特徴とする、上記(1)記載の遺伝子。

(3) 上記(1)記載の遺伝子を含む組換えベクター。

(4) 上記(1)記載の遺伝子を宿主に導入して得られる形質転換体。

15 (5) 宿主が植物である、上記(4)記載の形質転換体。

(6) 前記植物がナス科植物である、上記(5)記載の形質転換体。

(7) 上記(1)記載の遺伝子を植物に導入することにより、ネコブセンチュウ抵抗性を有する組換え植物を作製する方法。

(8) 上記(1)記載の遺伝子を含む、ネコブセンチュウ防除薬剤。

20

## 1. 新規ネコブセンチュウ抵抗性遺伝子

### (1) 本発明の遺伝子の特徴

本発明の遺伝子は、2倍性ジャガイモ系統より単離された、新規ネコブセンチュウ抵抗性遺伝子である。該遺伝子は、従来知られているネコブセンチュウ抵抗性遺伝子とは異なり、以下のような特徴を有する。

25

① トマトの抵抗性遺伝子(Mi遺伝子)のような優性ネコブセンチュウ抵

抗性遺伝子 (single dominant) とは異なり、遺伝子のコピー数に応じて抵抗性が増す「量的抵抗性」を持つ。

② トマトの抵抗性遺伝子のような高温感受性による抵抗性のブレイクダウンがない。

5 ③ 様々なネコブセンチュウの種や系統に幅広く対応できる。

## (2) 本発明の遺伝子の単離

本発明の遺伝子は、ネコブセンチュウ抵抗性遺伝子を有することが知られている 2 倍性ジャガイモ系統 85.37.38 (Watanabe et al. Amer. Potato  
10 J. 71: 599-604, 1994) のゲノム DNA または cDNA ライブラリーから、植物抵抗性遺伝子群に共通な NBS や LRR などの配列情報を基に検索することができる。例えば、Hammond-Kosack and Jones (1997 Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Biol. 48: 575-607) などの総論を参考に、既知の植物病虫害抵抗性遺伝子に保存的な領域、例えば NBS や LRR の配列に基づき、プライマ  
15 ーを設計する。そして、該プライマーを用いて、前記 2 倍性ジャガイモ系統の cDNA ライブラリーから、目的とする遺伝子を増幅、単離すればよい。

## (3) 塩基配列の決定

得られた遺伝子は、常法にしたがい塩基配列の決定をすることができる。  
20 塩基配列の決定は、マキシム-ギルバートの化学修飾法、M13 フェージを用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法、又は自動塩基配列解析装置 (PERKIN-ELMER 社製 : ABI PRISM 377 DNA Sequence System 等) を用いた方法等、公知の方法を利用すればよい。

配列番号 1 は、こうして特定された、本発明のネコブセンチュウ抵抗性  
25 遺伝子の塩基配列を示す。しかし、本発明にかかるネコブセンチュウ抵抗

性遺伝子は、上記配列に限定されず、配列番号 1 に示される塩基配列からなる遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる遺伝子も、(1)に記載した本発明の遺伝子に特徴的なネコブセンチュウ抵抗性を宿主に付与することができる限り、本発明の遺伝子に含まれるものとする。なお、ストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が 10mM~300mM、温度が 25℃~70℃、好ましくはナトリウム濃度が 50mM~100mM、温度が 42℃~55℃の条件をいう。

一旦本発明の遺伝子の塩基配列が確定されると、その後は化学合成によって、又は本遺伝子の cDNA もしくはゲノム DNA を鋳型とした PCR によって、あるいは核塩基配列を有する DNA 断片をプローブとしてハイブリダイズさせることによって、さらに本発明の遺伝子を得ることができる。

## 2. ベクター

本発明は、本発明の遺伝子を含む組換えベクターを提供する。該ベクターは、本発明の遺伝子をそのまま、又は適当な制限酵素で消化し、あるいは、適当なリンカーを連結して、プラスミド等の適当なベクターに導入することにより作製される。該ベクターとしては、pUC18、pUC19、pUC118、pUC119 等の pUC 系ベクター、pBI101、pBI121、pGA482 等のバイナリーベクターを挙げることができる。特に、アグロバクテリウムのバイナリーベクターを用いる場合は、該バイナリーベクターの境界配列間に外来遺伝子を挿入し、この組換えベクターを大腸菌内で増幅する。次いで、増幅した組換えベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス LBA4404、EHA101、EHA105、C58C1Rif<sup>R</sup> 等に、凍結融解法、エレクトロポレーション法等により導入し、これを形質転換体用ベクターとして用いる。

宿主内で外来遺伝子を発現させるためには、該遺伝子の前後に、それぞれプロモーターとターミネーターを配置させる必要がある。前記プロモ-



ターとターミネーターは特に限定されず、宿主内で機能することが知られている任意のものを用いることができる。植物を宿主とする場合であれば、例えば、プロモーター配列としては、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来の 35S 転写物 [The EMBO J. 6:3901-3907 (1987)、トウモロコシのユビキチン [Plant Mol. Biol. 18: 675-689 (1992) ]、ノパリン合成酵素 (NOS) 遺伝子、オクトピン (OCT) 合成遺伝子のプロモーターが挙げられる。またターミネーター配列としては、例えばカリフラワーモザイクウイルス由来やノパリン合成酵素遺伝子由来のターミネーター等が挙げられる。

さらに効率的に目的の形質転換体を選抜するために、有効な選択マーカー遺伝子を導入することが好ましい。該選択マーカーとしては、カナマイシン耐性を付与する遺伝子、抗生物質ハイグロマイシンに対する抵抗性を植物に付与するハイグロマイシンホストトランスフェクター (hpt) 遺伝子及びピアラフォスに対する抵抗性を植物に付与するホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ (bar) 遺伝子等を挙げることができる。こうした選択マーカー遺伝子と本発明の遺伝子は、単一のベクターと一緒に組み込んでも良いし、それぞれを別個のベクターに組み込んだ 2 種類の組換え DNA を用いてもよい。

### 3. 形質転換体

本発明はまた、本発明の遺伝子を導入した形質転換体を提供する。該形質転換体は、前述の本発明のベクターを用いて、宿主を形質転換することにより作製される。該宿主は、本発明の遺伝子が機能しうるものであれば特に限定されないが、植物であることが好ましく、例えば、ナス科植物、サツマイモ等のヒルガオ科植物、大根等の根菜類を含むアブラナ科植物等、

2000種以上の植物において有効に機能しうると考えられる。なかでも、ジャガイモ、タバコ、トマト等のナス科植物が好適である。なお、本発明において「植物」という言葉には、植物培養細胞、栽培植物個体、植物器官（例えば葉、花弁、茎、根、根茎、種子等）、又は植物組織（例えば表皮、師部、柔組織、木部、維管束等）のすべてを含むものとする。例えば、植物培養細胞、植物体、植物器官、又は植物組織を宿主とする場合、採取した植物切片に本発明の遺伝子を、アグロバクテリウムのバイナリーベクター法、パーティクルガン法、又はポリエチレングリコール法等を用いて導入することにより、目的とする形質転換体を得ることができる。あるいはプロトプラストにエレクトロポレーション法で遺伝子を導入して形質転換体を作製してもよい。

本発明の遺伝子が導入された形質転換体は、選択マーカーによるスクリーニング、又はネコブセンチュウ抵抗性という本発明の遺伝子が有する機能発現解析により、選抜することができる。得られた形質転換体、特に組換え植物は、土壌又はパーミキュライトを詰めたポットで栽培し、株分けすることによって増殖させることが可能である。こうして増殖させた組換え植物、及びその子孫もすべて、本発明の遺伝子を有する限り、本発明の形質転換体の範囲に含まれる。

#### 20 4. ネコブセンチュウ抵抗性を有する組換え植物

本発明のネコブセンチュウ抵抗性遺伝子を導入された組換え植物は、幅広い種のネコブセンチュウに対して強い抵抗性を有する。しかも、本発明の遺伝子によって付与される抵抗性は、遺伝子導入数に応じて抵抗性が増す「量的抵抗性」である。ちなみに、従来知られているネコブセンチュウ抵抗性遺伝子は量的抵抗性を持たない。したがって、導入する遺伝子数を

増加させることにより、本発明の遺伝子はより強力なネコブセンチュウ抵抗性組換え植物を作出することができる。

- 一方、これまで同定されているネコブセンチュウ抵抗性遺伝子は温度感受性であり、一定の温度以上に達すると抵抗性を失ってしまうものであった (Mi は通常 28℃ で失活する)。しかし、本発明の組換え植物は、33～35℃ という高い温度条件下で栽培してもネコブセンチュウに対する抵抗性維持することができる。したがって、本発明の遺伝子を導入した組換え植物は、温帯や熱帯など比較的気温が高い地域においても、ネコブセンチュウ抵抗性を維持し続ける組換え植物を作出することができる。
- かくして、本発明は、従来にないネコブセンチュウ抵抗性を有する組換え植物とその作製方法を提供することができる。

#### 5. その他

- 本発明の遺伝子は、宿主、特にジャガイモ、タバコ、トマト等のナス科植物に優れたネコブセンチュウ抵抗性を付与する。したがって、該遺伝子や該遺伝子を含む組成物は、ネコブセンチュウ防除薬剤として使用しうる。本発明の遺伝子や、該遺伝子を導入された組換え植物、該遺伝子を含むネコブセンチュウ防除薬剤は、ネコブセンチュウの被害が深刻な地域において、その被害を抑え、作物の生産性を向上させる重要な効果を有する。

20

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、サザン・ハイブリダイゼーションによる遺伝子導入の確認結果を示す。

図 2 は、RT-PCR 法による遺伝子導入の結果を示す。

2A : Primer : RNK    2B : Primer : Start2x2, PotalRR

図 3 は、ネコブセンチュウ感染 42 日後の根の状態を示す写真である。

3A:組換え体 3B:control 3C:TA209

図4は、ネコブセンチュウ感染42日後の根の顕微鏡写真(×40)である。

4A:組換え体 4B:control

- 5 本明細書は、本願の優先権の基礎である特願2002-089622号の明細書に記載された内容を包含する。

#### 発明を実施するための最良の形態

- 以下、実施例により本発明についてより詳細に説明するが、本発明はこ  
10 れらに限定されるものではない。

#### 〔実施例1〕 遺伝子領域の単離

- 抵抗性遺伝子を有することが知られている2倍性ジャガイモ系統  
85.37.38 (Watanabe et al. Amer. Potato J. 71: 599-604, 1994) のゲノ  
ムDNAから、以下のプライマー設計し、PCRにより遺伝子を単離した。  
15 なお、プライマーは、既知の植物病虫害抵抗性遺伝子に保存的な領域、例  
えばNBSやLRRの配列に基づいて設計した。

Forward: 5' -GATCCATTCTATAATGTCTCACT-3' (配列番号2)

Reverse: 5' -CTATCTATAAGATCTTTAATCA-3' (配列番号3)

- 20 単離されたRmi遺伝子候補を(Fragment #93)と命名し、その全配列(配列  
番号1)及び既知の遺伝子との相同性(表1)を調べた。

〔表 1〕

	遺伝子	相同性
	<i>Solanum acaule</i> NBS-LRR protein	69%
	<i>Solanum tuberosum</i> RGC	70%
5	<i>Solanum tuberosum</i> NBS-LRR prote	69%
	<i>Solanum tuberosum</i> Disease d resistance protein Gpa	69%
	<i>Solanum tuberosum</i> Rx protein	69%
	<i>Capsicum chacoense</i> disease resistance ProteinBS2	54%
	<i>Lycopersicon esculentum</i> Prf protein	54%
10	<i>Lycopersicon esculentum</i> PRF protein	52%
	<i>Lycopersicon pimpinellifolium</i> Prf proteit	53%
	<i>Lycopersicon esculentum</i> tospovirus resistance protein D protein	54%
	<i>Arabidopsis thaliana</i> putative protein	96%
	<i>Arabidopsis thaliana</i> RPP13 protein	48%
15	<i>Arabidopsis thaliana</i> rpp8 protein	47%
	<i>Oryza sativa</i> Putative disease resistance protein protein	47%
	<i>Arabidopsis thaliana</i> viral resistance protein protein	48%
	<i>Arabidopsis thaliana</i> disease resistance protein RPM1 isolog	48%
	<i>Arabidopsis lyrata</i> NBS/LRR disease resistance protein RPM1 protein	51%
20	<i>Brassica napus</i> disease resistancegene homolog 9N protein	49%
	<i>Oryza sativa</i> RPR1h protein	47%
	<i>Oryza sativa</i> RPR1 protein	46%
	<i>Brassica napus</i> disease resistance	48%
	<i>Triticum aestivum</i> stripe rust resistance protein Yr10 protein	53%
25	<i>Triticum aestivum</i> stripe rust resistance protein Yr10 protein	52%
	<i>Oryza sativa</i> Pi-b protein protein	86%
	<i>Oryza sativa</i> Pib protein	56%
	<u><i>Fusarium oxysporum</i> protein</u>	50%

該バイナリーベクターの境界配列間に外来遺伝子を挿入し、この組換えベクターを大腸菌内で増幅した。次いで、増幅した組換えベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス LBA4404、EHA101、EHA105、C58C1Rif<sup>R</sup> 等に、凍結融解法、エレクトロポレーション法等により導入し、これを

5 植物の形質転換体作出用に用いた。

## 〔実施例 2〕 ベクターの構築

### (1) バイナリーベクターへの挿入

単離された Rmi 遺伝子候補 (Fragment #93) は、BamHI で切断し、一度 p

10 Target ベクターにリゲーションしてから再度 BamHI で切り出し、バイナリーベクター： pBE2113Not にリゲーションした。得られた組換えベクターは、E coli DH5  $\alpha$  に導入して増幅し、アグロバクテリウム導入用ベクター (PotatoRKN:pBE2113NotI) を得た。

### 15 (2) エレクトロポレーション

バイナリーベクター (PotatoRKN:pBE2113NotI) をエレクトロポレーションによって *Agrobacterium tumefaciens* LB4404 株 (Gibco BRL) に導入した。すなわち、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存されている *Agrobacterium tumefaciens* LB4404 株を氷上で解凍し、クリーンベンチ内で 1.5 ml エッペンドルフチューブに 20  $\mu\text{l}$  程取り出す。そこに 100 ng/ $\mu\text{l}$  の DNA を 1  $\mu\text{l}$  加えて氷

20 上で静置した後、キュベットに移しエレクトロポレーションを行った。

### (3) 遺伝子導入の確認

次いで、YM 培地を 50  $\mu\text{l}$  加えて吸い上げ、15 ml のファルコンチューブに移し、YM 培地をさらに全量で 1 ml まで加え、225 rpm、3 時間、30  $^{\circ}\text{C}$

25

で振とう培養した。3 時間後、カナマイシンを含む YM 寒天培地上に 200  $\mu$ l スプレッドし、48~56 時間、30  $^{\circ}$ C で培養し、形成されたコロニーについて PCR、DNA シークエンシングを行い、遺伝子導入を確認した。

#### 5 (4) コロニーPCR

遺伝子導入が確認された *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 株のコロニーを取り出し、表 2 の組成でコロニーPCR を行った。また、得られた PCR 産物を 1  $\mu$ l 取り出し、少量の blue juice と混合した後、0.5 %TAE に 2 % 量のアガロースを溶かしたゲルで泳動した。マーカーは  $\lambda$  HindIII (ボーリンガーマンハイムのマーカーII) を用いる。その後、表 2 の割合で混合した溶液を 8 連チューブに入れ、PCR 機 (Gene Amp 9600 : Perkin-Elmer 製) にかけた。

〔表 2〕

名称	必要量
Buffer	2.50 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 150mM	0.5 $\mu$ l
dNTP	2 $\mu$ l
Primer-Forward(PoMi-F-1、1pmol/	2.5 $\mu$ l
Primer-Rivers(PoMi-R-1、1pmol/	2.5 $\mu$ l
Taq-porimerase 10 u/ul	0.25 $\mu$ l
template	arbitrary
dH <sub>2</sub> O	+ $\alpha$
合計	25 $\mu$ l

15

上記反応液を 1.5 ml の Locking Tube に移し、75%イソプロパノール 80  $\mu$ l 加えて混合後、室温で 15 分放置し、20 分遠心 (室温・最大スピード) した。上澄みを除き、さらに 75%イソプロパノールを 250  $\mu$ l 加えて混合後、5 分遠心 (室温・最大スピード) し、上澄みを除いてドラフト内で乾燥させた。次に、Template Suppression Reagent (TSR) を 25  $\mu$ l ずつ入

20

れて混合し、スピンドウンして、ヒートブロックで 95 °C、3 分、熱ショックをかけた。これを氷上に放置し、DNA sequencingr310 専用のチューブに移し換え、DNA シークエンシングを行った。

5 遺伝子導入が確認された *Agrobacterium tumefaciens* LB4404 株のコロニーを取り出し、カナマイシン 100mg/l 入れた YEB 培地で 30 °C、225 rpm で一晩振とう培養する。この培養した菌液をクリオチューブに 850  $\mu$ l ずつ氷上で分注し、グリセリン 150  $\mu$ l を加え、蓋をしてパラフィルムを巻いた後、ボルテックスを用いて混和した。これを -20 °C で冷やしておいた 99.5% エタノールにラップに包んでつけ、10 分程度 -20 °C の冷凍庫で冷  
10 やす。その後 -80 °C で冷やしておいた保存ケースに入れて保存した。

### 〔実施例 3〕 組換え植物の作出

実施例 2 で作製したベクターを用いてネコブセンチュウ抵抗性遺伝子領域を導入した組換え植物を作出した。宿主植物としては、再分化や成長が  
15 早いネコブセンチュウ感受性の 2 倍体の *Nicotiana benthamiana* (ナス科植物) を用いた。これと平行してネコブセンチュウ感受性の 4 倍体ジャガイモ品種 Desiree にも遺伝子導入を行った。

#### (1) 植物体への *Agrobacterium tumefaciens* の感染

実施例 2 で作製した *Agrobacterium tumefaciens* LB4404 株を氷上で溶  
20 かしておく。クリーンベンチ内で 50 ml ファルコンチューブに YEB 培地 40 ml を移し、抗生物質を入れて転倒混和し、1 チューブあたり 10 ml ずつ分注した。そこに *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 株 10  $\mu$ l を加えて、振とう培養機で一晩培養し (28 °C、225 rpm)、培養液の吸光度を波長 600nm 分光光度計を用いて測定した。なお、このときの吸光度は約 2 程度あるの  
25 で YEB 培地を用いて吸光度が 0.6~0.8 になるように希釈した。



継代後 2～3 週齢の植物体は、滅菌済み濾紙上でメスを用いて傷つけ、根、茎、葉に切り分けて、乾燥しないように滅菌水につけた。傷をつけた植物断片は吸光度 0.6～0.8 に調整した *Agrobacterium tumefaciens* 溶液に 7 分間浸し、滅菌済み濾紙上に取り出して十分に水分を切り、共存培地で 3 日間培養した。なお、共存培地は、ベンジルアデニン (BA) 1mg/l、Trans Zeatin Riboside 35 mg/l、インドール酢酸 0.1mg/l を加えたものを用いた。

## (2) 共存培地への継代

10 前項同様共存培地を作製し、これをシャーレに 20 ml ずつ分注し、滅菌した円形濾紙を載せ、感染させた植物体を移して 3 日間培養した。

〔表 3〕

改変 MS 培地組成：下記に、シュクロース 30g、を加え 1 l にメス  $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、KOH または HCl を用いて pH5.9 に調整した後、ジェランガム 2.5 g を加えたもの。

Sol No	構成成分	名称	最終濃度	Sol 濃度
Sol 1 (20ml/l)	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	硝酸アンモニウム	1650mg	82.5g/l
	$\text{KNO}_3$	硝酸カリウム	1900mg	95.0g/l
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	塩化カルシウム二水和物	440mg	22.0g/l
Sol 2 (10ml/l)	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	硫酸マグネシウム七水和物	370mg	37.0g/l
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	リン酸二水素カリウム	170mg	17.0g/l
Sol 3 (20ml/l)	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物	37.3mg	1.87g/l
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	硫酸鉄(II)七水和物	27.8mg	1.39g/l
Sol 4 (10ml/l)	$\text{H}_3\text{BO}_3$	ホウ酸	6.2mg	620mg/l
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	硫酸マンガン(II)四水和物	22.3mg	2230mg/l
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	硫酸亜鉛七水和物	8.6mg	860mg/l
	KI	ヨウ化カリウム	0.83mg	83mg/l
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	モリブデン酸ナトリウム	0.25mg	1ml/l
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	硫酸銅(II)五水和物	0.025mg	1ml/l
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	塩化コバルト(II)六水和物	0.025mg	1ml/l
Sol 5 (10ml/l)	Thiamine-HCl	ビタミンB1塩酸塩	0.5mg	50mg/l
	Myo-inositol	myo-イノシトール	0.1mg	10g/l
	Pyridoxin	ピリドキシン塩酸塩	0.5mg	50mg/l
	Nicotinic acid	ニコチン酸	5mg	500mg/l
15	Glycine	グリシン	2mg	200mg/l
	Biotin	D-ビオチン	0.05mg	5mg/l
	Folic acid	葉酸	0.5mg	50mg/l

(3) カルス形成用培地への継代

表 3 の改変 MS 培地にベンジルアデニン 1 mg/l、NAA 0.1 mg/l、カナマイシン 150 mg/l、カルベニシリン 200 mg/l を加えてカルス形成用培地とし、これをシャーレに 20 ml ずつ分注する。このカルス形成用培地に、共存培地で 3 日間培養した植物体断片を順次継代した。

(4) シュート育成用培地への継代

表 3 の改変 MS 培地にカナマイシン 150 mg/l、カルベニシリン 200 mg/l を加えてシュート育成用培地とし、シャーレに 20 ml ずつ分注する。このシュート育成用培地に、カルス形成用培地で 2 週間程度培養してカルスが形成された植物体断片を順次継代し、一日中、光（蛍光灯光）のあたる部屋で培養した。

(5) MS 試験管培地への継代

表 3 の改変 MS 培地を 1 本の試験管に 5 ml ずつ分注し、オートクレーブで滅菌処理する。これに、シュート育成用培地で再分化させた個体を、完全に独立した個体を 1 系統として継代した。

(6) 発根 (Rooting) 用培地への継代

表 3 の改変 MS 培地にカナマイシン 75 mg/l、カルベニシリン 100 mg/l を加えて培養瓶に 40 ml ずつ分注し、発根用培地とする。MS 試験管培地で 1~2 週間培養し植物体の大きさが 2~3 cm に達した固体を、順次この発根用培地へ 1 瓶 3 個体程度継代した。

(7) 順化

プランターに市販の野菜用の土を入れ、発根用培地で3週間程度培養し、しっかりと根が伸長した個体を移植して育てた。

〔実施例4〕 サザン・ハイブリダイゼーションによる遺伝子導入の確認

- 5 再生個体を選択培地であるカナマイシンを含む培地で育て、発根を主体とした成長の可否を指標として、成長の良好な系統を暫定的に組換え体候補として選抜した。この組換え体候補についてサザン・ハイブリダイゼーションにより遺伝子導入を確認した。

(1) 試験方法

- 10 この暫定的組換え体候補系統群について、DNAを抽出し、実施例1で使  
用したプライマー（配列番号2及び3）を用いてPCRを行い、ネコブセン  
チュウ抵抗性遺伝子領域を増幅した。

- PCRにより、遺伝子領域が導入されていると認められた系統について、  
実施例1で決定された Rmi の配列（配列番号1）をプローブとしてサザン  
15 ハイブリダイゼーションを行い、導入された遺伝子の数を推定した。ハイ  
ブリダイゼーションの条件を表4に示す。

〔表4〕

step	condition	time
Baking	80 °C	2 hours
Prehybridization	55 °C	4 hours
Hybridization	55 °C	17 hours
Primary wash	55 °C	10 min×2
Secondary wash	室温	5 min×2
Expose	暗黒下	3 hours

20 (2) 結果

図1の結果をみると、ControlにもPositiveな反応が出ている。これは、非組換え体の植物にも Hybridize する相同な領域を持っているために

Positive な反応が出たものと思われた。そこで Control とバンドの形態が異なり、かつ Control よりもバンド数の多い個体を、遺伝子導入された固体と判断した。

## 5 〔実施例 5〕 RT-PCR による遺伝子導入の確認

### (1) 試験方法

#### 1) cDNA の合成

乳鉢で液体窒素を用いて植物体を粉末状になるまで磨り潰し、常法に従い mRNA を抽出した。この mRNA をもとに、TAKARA RNA PCR Kit (タカラ社製) に添付された Random 9mer と M13PrimerM4 に dT を付加したプライマーを用いて、表 5 に示す反応組成で逆転写反応を行い、cDNA を合成した。なお、用いたプライマーと反応条件は以下のとおりである。

〔表 5〕

#### 逆転写反応の組成

MgCl <sub>2</sub>	4 ul
10 × RNA PCR buffre	2 ul
dNTP Mixture	2 ul
RNase Inhibitor	0.5 ul
Revers Transcriptase	1 ul
Random 9 mers or Oligo dT-Adaptor Primer	1 ul
Template(mRNA)	9.5 ul
計	20 ul

#### <Random 9 mers Primer を用いた反応>

Random 9mer: dp (5'-NNNNNNNN-3')

反応条件: 30 °C 10 min プレインキュベート

20 42°C 30 分、99°C 5 分、55°C 5 分、1 サイクル

<Oligo dT-Adaptor Primer を用いた反応>

Oligo dT Adaptor : M13PrimerM4: 5'-gttttcccag tcacgac-3' (配列番号 4)

に oligo-dT を付加したもの。

反応条件 : 42℃ 30 分、99℃ 5 分、55℃ 5 分、1 サイクル

5 2) PCR 反応

次に、得られた cDNA を用いて PCR を行った。PCR 反応は、GeneAmp 9600 (Applied Biosystems 製) を用いて、以下に示すプライマー (Primer:RKN と Primer: Start2×2、Primer:PotaLRR) および反応条件で行った。

<Primer:RKN を用いた PCR 反応>

10 Primer RKN-F1: GTTGGTCATGAAAATGAA (配列番号 5)

Primer RKN-R1: ATATTGCTCTTCCAATCA (配列番号 6)

〔表 6〕

Primer:RKN を用いた PCR 反応組成

名称	必要量
10x Buffer	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 150mM	1 $\mu$ l
dNTP 2mM	4 $\mu$ l
Primer-Forward(RKN-F1、1pmol/ $\mu$ l)	5 $\mu$ l
Primer-Rivers(RKN-R1、1pmol/ $\mu$ l)	5 $\mu$ l
Taq-polymerase 10u / ul	0.5 $\mu$ l
template	275 ng
dH <sub>2</sub> O	+ $\alpha$
合計	50 $\mu$ l

15 反応条件 : 95℃ 10 分、95℃ 1 分、55℃ 2 分、72℃ 3 分 30 サイクル

最終伸張 72℃10 分

<Primer: Start2×2、PotaLRR を用いた反応>

Primer Start2X2: ATGGCTTATGCTGCTATTACTTGT (配列番号 7)

Primer PotaLRR: CTAAGTATACAGACCTCAACAGA (配列番号 8)

〔表 7〕

Primer: Start2×2、PotaLRR を用いた PCR 反応組成

名称	必要量
Buffer	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	1 $\mu$ l
dNTP	4 $\mu$ l
Primer-Forward(Start2 × 2-F、1pmol/ $\mu$ l)	5 $\mu$ l
Primer-Rivers(PotaLRR-1、1pmol/ $\mu$ l)	5 $\mu$ l
Taq-porimerase	0.5 $\mu$ l
template	275 ng
dH <sub>2</sub> O	+ $\alpha$
合計	50 $\mu$ l

反応条件：95℃ 10 分、95℃ 1 分、55℃ 2 分、72℃ 3 分 30 サイクル

5 最終伸張 72℃10 分

### 3) 電気泳動

上記で得られた PCR 産物を電気泳動し、そのバンドの違いを比較することによって遺伝子導入の有無を判断した。

## 10 (2) 結果

RT-PCR の結果を図 2 に示す。13 より、Primer:RKN と Primer: Start2×2、PotaLRR において、Control にはバンドは検出されず、組換え体候補（個体 8 及び 9）にはバンドが検出された。これより、組換え体における遺伝子導入と転写が確認された。

15

### 〔実施例 6〕 組換え植物の抵抗性評価

#### (1) 試験方法

遺伝子導入が確認された *Nicotiana benthamiana* 組換え体 (No. 1, No. 8, No. 14, No. 18 など)、*Nicotiana benthamiana* の非組換え体、及びネコブセンチュウ感受性であるトマト系統 TA209 にネコブセンチュウ (*Meloidogyne*

20

incognita) を感染させた。そして、その後の植物体地上部や根の様子を肉眼、及び顕微鏡で観察した。

また、遺伝子導入が確認された *Nicotiana benthamiana* 組換え体 (No. 1, No. 8, No. 14, No. 18 など)、非組換え体、及び TA209 を、ネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*) 感染土壌で栽培して、抵抗性を評価した。同様に栽培して評価した。評価は、常法 (Williamson et al. Plant Cell, 1998) に従い、Erioglaucine (Sigma-Aldrich) を用いてネコブセンチュウの卵を染色し、卵の有無や数を測定し、これにより抵抗性を評価した。また、この際に、根中の成虫の存在についても確認を行った。こうして、遺伝子導入数とセンチュウ抵抗性の関係を調べた。

## (2) 結果

組換え体の根の状態は、非組換え体及び TA209 の地上部の状態と比べて黄化の程度が進んでおらず、根瘤数も少なかった。さらに根を顕微鏡で観察したところ、組換え体では根に瘤状の変形は見られなかったが、非組換え及び TA209 では根に瘤状の変形が見られ、その中にセンチュウの卵と思われる影を観察することができた。以上より、本発明の遺伝子を導入した組換え植物は、高いネコブセンチュウ抵抗性を有することが確認された (図 3 および図 4)。

さらに、本発明の組換え植物は、33～35℃ という高い温度条件下で培養・栽培してもネコブセンチュウに対する抵抗性維持し続けることができた。したがって、本発明の遺伝子は Mi 遺伝子のような高温感受性 (28℃ で失活) がないことが確認された。

〔実施例 7〕 タバコ野生種におけるネコブセンチュウ抵抗性評価

### (1) 試験方法

実施例 2 で作製したベクターを用いて、実施例 3 の方法にしたがい、タバコ野生種にネコブセンチュウ抵抗性遺伝子を導入した。遺伝子導入したそれぞれの系統について、サザンハイブリダイゼーション及び RT-PCR によって遺伝子導入を確認した。さらに、組換え植物をネコブセンチュウ (Root-knot nematodes) 感染土壌に植え、温室内において、昼間 (16 時間) は 30-35℃、夜間 (8 時間) は 25-30℃ で 6 週間育成し、抵抗性を評価した。抵抗性は、まず根の根瘤を観察し、根瘤のないものについてさらに顕微鏡観察を行って評価した。結果を表 8 に示す。

10

### (2) 結果

表 8 より明らかなように、本発明のネコブセンチュウ抵抗性遺伝子はトマトの mi 遺伝子等の従来のネコブセンチュウ抵抗性遺伝子にはない、量的抵抗性を有することが確認された。

15



〔表 8〕

系統	Southern	RT-PCR *	抵抗性 **
	挿入遺伝子数		
N. benthamiana	control	N	S
IK-1	1	N	S
IK-2	1	N	S
IK-3	1	P	MR
IK-4	3	P	HR
IK-6	2	P	R
IK-7	0	--	S
IK-11	1	P	MR
IK-12	1	P	MR
IK-14	2	P	R
IK-15	3	P	HR
IK-16	0	--	MS
IK-17	0	--	S
IK-18	0	--	MS
IK-19	0	--	S
IK-20	0	--	S
IK-24	1	N	MS

1) 数字:挿入遺伝子数

2) N: Negative, P: Positive --: 評価不可

3) HR: 根瘤、卵いずれもナシ

5 R: 根瘤ナシ、いくつかの卵が根に認められる

MR: いくつかの根瘤、及び卵が根に認められる

MS: 多数の根瘤が根に認められる

S: 多数の根瘤が根全体に認められる

〔実施例 8〕 ジャガイモ栽培種におけるネコブセンチュウ抵抗性評価

(1) 試験方法

実施例 2 で作製したベクターを用いて、実施例 3 の方法にしたがい、ジャガイモ栽培種 (Desiree) にネコブセンチュウ抵抗性遺伝子を導入した。

- 5 遺伝子導入したそれぞれの系統について、サザンハイブリダイゼーション、PCR、及び RT-PCR により遺伝子導入を確認した。さらに、組換え植物をネコブセンチュウ (Root-knot nematodes) 感染土壌に植え、温室内において、昼間 (16 時間) は 30-35℃ で、夜間 (8 時間) は 25-30℃ で 6 週間育成し、抵抗性を実施例 7 と同様の方法で評価した。なお、control として未処理
- 10 の Desiree、およびネコブセンチュウ感受性の Atzimba (ジャガイモ)、TA209、*N. benthamiana* も同様に育成し、評価した。結果を表 9 に示す。

(2) 結果

- 表 9 より明らかなように、本発明のネコブセンチュウ抵抗性遺伝子はジャ
- 15 ヤガイモ栽培種においても、量的抵抗性を示すことが確認された。

〔表 9〕

系統	Southern <sup>1)</sup>	RT-PCR <sup>2)</sup>	抵抗性 <sup>3)</sup>	PCR <sup>4)</sup>
	挿入遺伝子数			
Desiree	control	N	S	N
RKN-2	2	P	R	P
RKN-15	2	P	R	P
RKN-16	3	P	HR	P
RKN-29	3	P	R	P
RKN-34	2	P	R	P
RKN-36	3	P	HR	P
RKN-37	2	P	MR	P
RKN-38	2	P	R	P
RKN-39	2	P	R	P
RKN-40	3	P	HR	P
RKN-101	I	N	S	N
RKN-103	1	P	MR	P
RKN-104	1	P	S	P
RKN-105	1	P	MR	N
RKN-106	I	N	S	N
RKN-107		P	R	P
RKN-108	2	P	MR	P
RKN-110	1	P	MS	P
RKN-111	3	P	HR	P
RKN-135	3	P	R	P
Control				
N. benthamiana	--	N	S	N
TA209 tomato	--	N	S	N
Atzimba	--	N	S	N

1) 数字:挿入遺伝子数、I:control 及び未処理と同じパターンの系統

2) N: Negative, P: Positive

3) HR: 根瘤、卵いずれもナシ

5 R: 根瘤ナシ、いくつかの卵が根に認められる

MR: いくつかの根瘤、及び卵が根に認められる

MS: 多数の根瘤が根に認められる

S: 多数の根瘤が根全体に認められる

4) N: Negative, P: Positive

本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

5 産業上の利用の可能性

本発明により、高温感受性がなく、様々なネコブセンチュウの種や系統に幅広く対応できる、量的抵抗性を有する新規ネコブセンチュウ抵抗性遺伝子が提供される。該遺伝子を利用すれば、ジャガイモ、トマト、タバコ等の重要な作物に、高いネコブセンチュウ抵抗性を付与することができる。

10

配列表フリーテキスト

配列番号 2 - 人工配列の説明：プライマー

配列番号 3 - 人工配列の説明：プライマー

配列番号 4 - 人工配列の説明：プライマー

15 配列番号 5 - 人工配列の説明：プライマー

配列番号 6 - 人工配列の説明：プライマー

配列番号 7 - 人工配列の説明：プライマー

配列番号 8 - 人工配列の説明：プライマー

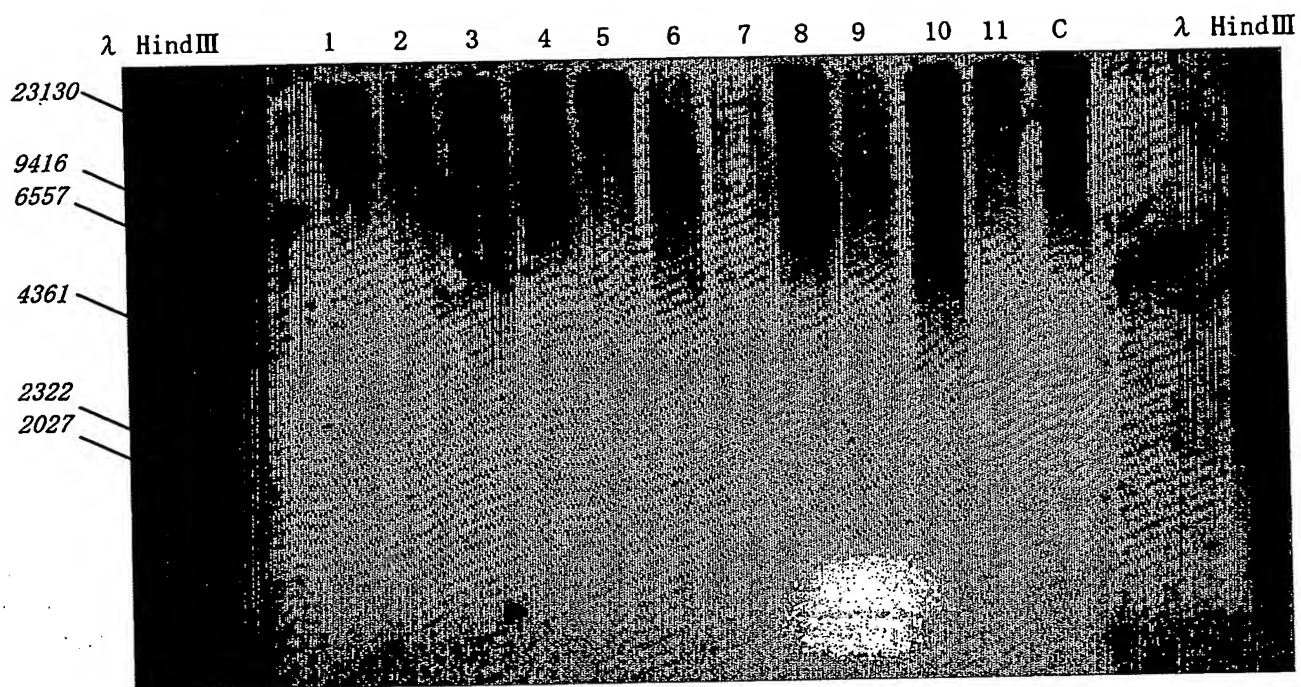
20

## 請 求 の 範 囲

1. 以下の (a) 又は (b) の DNA からなる遺伝子。
  - (a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA。
  - 5 (b) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ宿主にネコブセンチュウ抵抗性を付与する DNA。
2. 前記ネコブセンチュウ抵抗性が、遺伝子のコピー数に応じて抵抗性が増す量的抵抗性であることを特徴とする、請求の範囲第 1 項記載の遺  
10 伝子。
3. 請求の範囲第 1 項記載の遺伝子を含有する組換えベクター。
4. 請求の範囲第 1 項記載の遺伝子を宿主に導入して得られる形質転換体。
5. 宿主が植物である、請求の範囲第 4 項記載の形質転換体。
- 15 6. 前記植物がナス科植物である、請求の範囲第 5 項記載の形質転換体。
7. 請求の範囲第 1 項記載の遺伝子を植物に導入することにより、ネコブセンチュウ抵抗性を有する組換え植物を作製する方法。
8. 請求の範囲第 1 項記載の遺伝子を含む、ネコブセンチュウ防除薬剤。

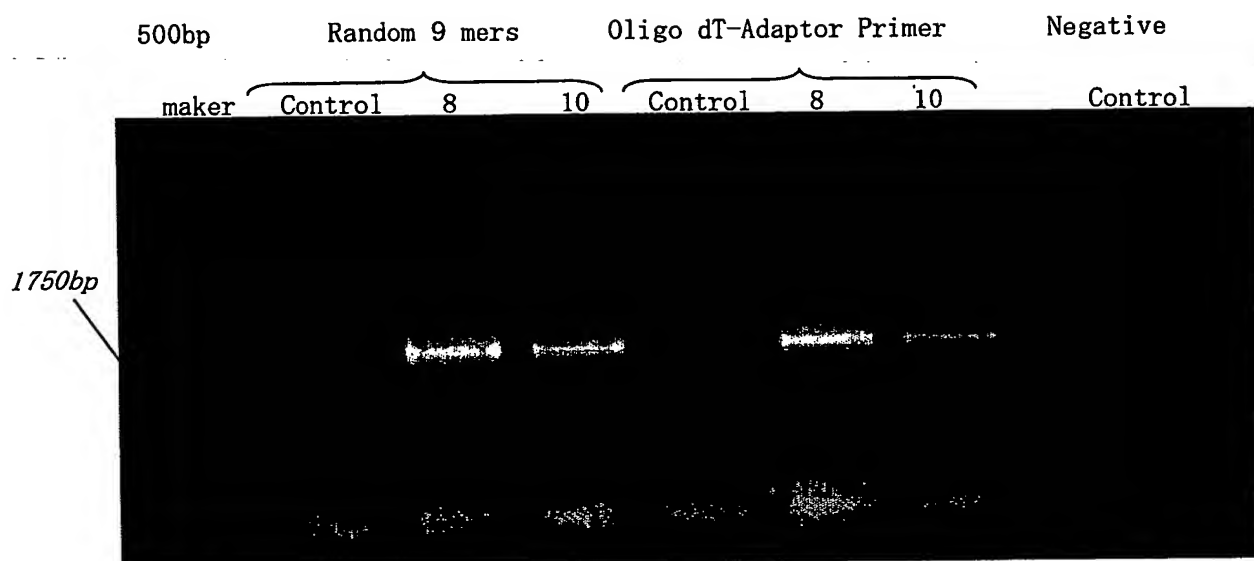
1/4

図 1



☒ 2

## 2 A Primer: RKN



## 2 B Primer: Start2 PosaLRR

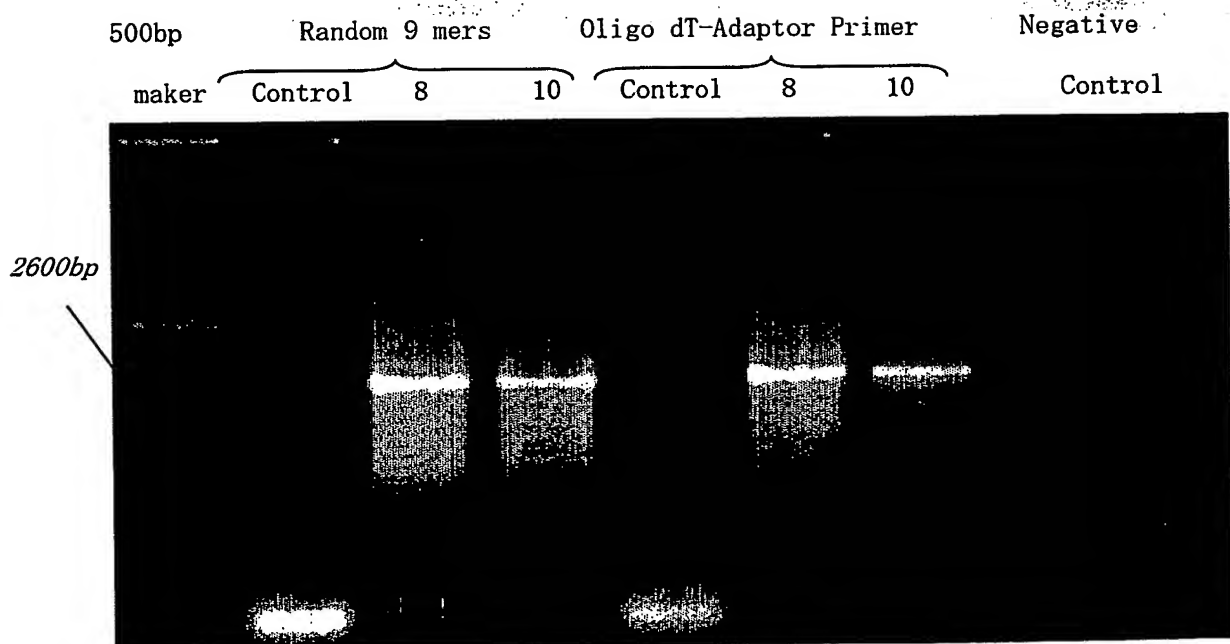
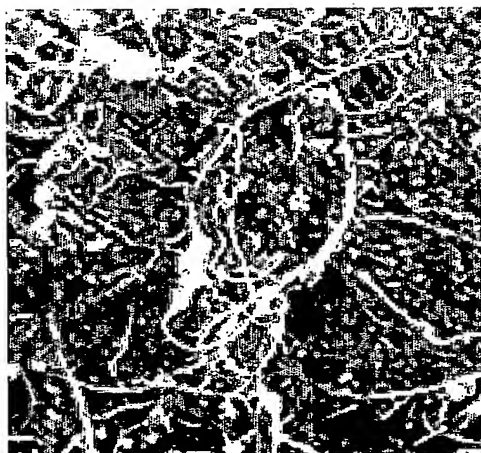


図 3

3 A : 組換え体



3 B : Control



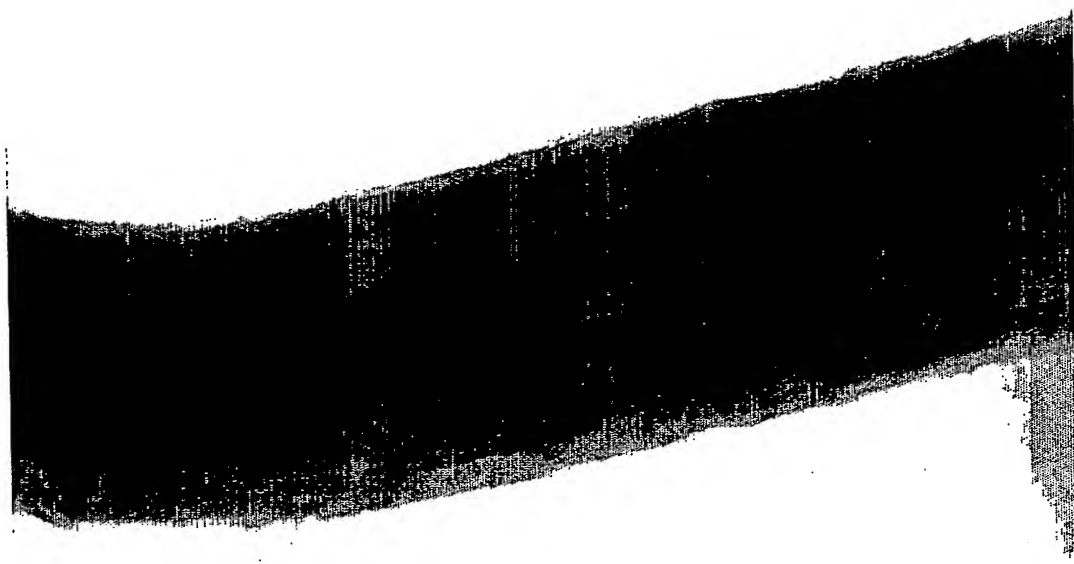
3 C : TA209



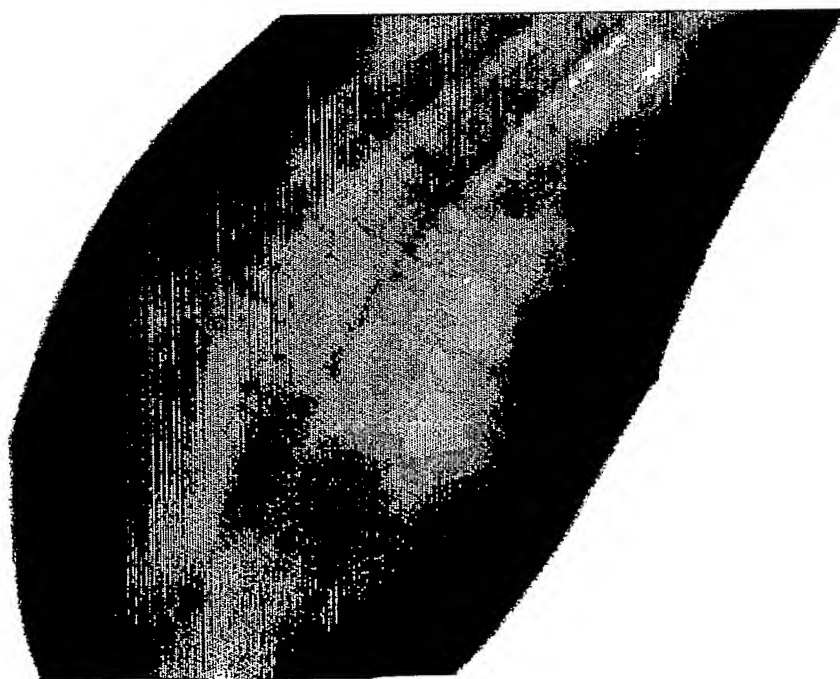


図 4

4 A : 組換え体



4 B : Control



## SEQUENCE LISTING

<110> Japan as Represented by President of The University of Tsukuba

<120> A New Root-knot Nematodes Resistance Gene and Its Use

<130> PH-1611-PCT

<150> JP 2002-89622

<151> 2002-03-27

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2613

<212> DNA

<213> Solanum tuberosum

<400> 1

```
atggcttatg ctgctattac ttgtcttatg agaaccatac aacaatctat tcaacttact 60
ggatgtaatt tgcaatcatt ctatgaaaag ttggaatctt tgagagcttn tttggagaaa 120
cacacgggca atcttgatgc attgaaaagc ttggaagctg aaatcataga acttgatgc 180
actacagaag atatcttgga cttggaatca agaaatgita aaaatccaat ttcaagaata 240
atagcttttt ggaaacttca ttctctcttg aaacaagcag taggacgcat tgattccacg 300
ctgaacaagt ggatggaaat gcagaacatg tacaccaaaa ggaaagatga agaagcacat 360
aacttggatc ttgctagtac tgcatacatg tctcaacatg ttgtggagcc tcaggatatg 420
atggttggac atgaaaatga actcgagatg atcatgcagg atcagcttgc tagaggagca 480
```

agtgaacttg aagttgtctc cattgtaggt atggggggca tcggtaagac aactttggct 540  
gacaaaattt ataatgatcc attcataatg tcacactttg acattcgtgc aaaagctact 600  
gtttcacaag agtattgcgc gaaaaatgta tgcctaagtc ttctttcttc tataagtgga 660  
aagagcaatg agcatcaaga tgatgggcaa ctagctgac gactgcaaaa aagtctaaaa 720  
gggaggaggt atttagtagt cattgatgac atatggaccg aacgagcttg ggatgatatg 780  
aaactatgtt tccagattg taactgtgga agcagaatac tgctgacaac tcggaatatg 840  
gaagtagcta agtatgctag ctcaggtaag cctcctaaga atcaaatgcg actcttgaat 900  
attgatgaaa gttagaagtt actaccaggt agagtccttg taaaaaactg tttctccct 960  
gaatttgaac aacttgggaa acaaatgtc cttaaagtc ggggattacc ttagctatt 1020  
atcgttattg ctggagtct gtctaataat ggtgagtcac ttgatgaatg gacaagtgtt 1080  
gcagagaatg taagttcagt ggtaagtaca gatcacaatg tacaatgcat gagagtgttg 1140  
gcgttgagtt atcatcactt accacatcac ttgagagcgt gttttctata ttttgcaata 1200  
ttcccgagg atacagtatg ttttgtgaat aaacttgtga aattatggac agcagagggt 1260  
tttttgaaga cagaaatgat gaaaagtata gaagaagttg cagaaaaatg tgttaaagat 1320  
cttatagata gaaatttagt ttttgtctc aggtgagta gttttgatgg aaaaataaaa 1380  
gcttgttgaa tgcattgatg gatccgigaa ctctgcttga gagaagctcg aaacncaaat 1440  
tttgtgaatg ttataatgga taatcaaat ccatgtgaac aatccatgaa ttattccaca 1500  
aagggagttc ggataagtat ccaatccaaa ctgtctgcca atcagttgtc tatggtttgt 1560  
aataacgatt cctattctgt tctcgttttt actgaagatc cctcaagctc aagaatggtg 1620  
cagggcttga agcatttcaa ggtactaaga gtacttatct tgcttcggtg gcattgcatg 1680  
tttcccaatt gcatagtga actatttcac ttgagataac taggtttgag tgtttactcg 1740  
tccactaatg attgggatat ttgttttcca tcctcaatag ctagccttga gtatttcaa 1800  
actttaatac ttaagtttcc aacatctctc ggatggaagt tcactagact tttcagatta 1860  
ccatcgagta ttttcaagat gtcgcaattg aggcattctat ctttgactg gaattacttg 1920  
aatggacatg aatctagcga gagatcaagt tgggttttga gaaatcttga gtgtctgtct 1980  
ggatggaatc ctttatcttg tacttcttcg gtttttagac tacttccgaa tgtaaagaag 2040  
ttgcaaatat gtggtatcca agaagactac ataagaaagg acaaggctt tgatgatctt 2100  
tgctgcttaa atcagcttac agaattgaaa ttttaagatta gaaagatgat tggaagagca 2160  
atataatgata catcttttgt tcttctcct ctaggtgctt ttccgaagaa ccttaagaag 2220

ttagcttitta caggtactcg ttgcatlgtg aaggatttgg agattcttgg taagttgcct 2280  
aaactcgagg ccctcaaact aggatatgat gcctgcattg gtactgattg ggaagtaggt 2340  
gaggaagggt ttccacactt gaagttcttg cgattgaagc atttgtactt gcataactgg 2400  
agagctagta gtgatcatit tccacgactt gaacgactag tcattaaccg tcgttggagc 2460  
atgtattcga tcccacagga tttttagtag ataaccacac ttcagctgat tcatataann 2520  
gactctgcaa aatctgttgg gaactccgcc aagaagattc agcaggaaat tgaagacagc 2580  
tatggaagtt ctgttgaggt ctgtatcagt tag 2613

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 2

gatccattct ataatgtctc act

23

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 3

ctatctataa gatctttaat ca

22

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 4

gttttcccag tcacgac

18

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 5

gttggatcatg aaaatgaa

18

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 6

atattgctct tccaatca

18

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 7

atggcttatg ctgctattac ttgt

24

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 8

ctaactgata cagacctcaa caga

24

特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

FILED 22 AUG 2003

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 PH-1611-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO2/12392	国際出願日 (日.月.年) 27.11.02	優先日 (日.月.年) 27.03.02
国際特許分類(IPC) Int. Cl <sup>1</sup> C12N15/29, C12N5/14, A01N25/00, A01H5/00		
出願人(氏名又は名称) 筑波大学長が代表する日本国		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。  
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で                      ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。  
I ☒ 国際予備審査報告の基礎  
II ☐ 優先権  
III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成  
IV ☐ 発明の単一性の欠如  
V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明  
VI ☐ ある種の引用文献  
VII ☐ 国際出願の不備  
VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 27.03.03	国際予備審査報告を作成した日 05.08.03	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 鈴木 美葉子 (印)	4N 9839
電話番号 03-3581-1101 内線 3488		



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出された PCT 規則 3.1(b) による翻訳文の言語  
☐ PCT 規則 48.3(b) による国際調査の言語  
☐ 国際予備審査のために提出された PCT 規則 55.2 または 55.3 による翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出された磁気ディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出された磁気ディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列と磁気ディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT 規則 70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記 1. における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	2-8	有
	請求の範囲	1	無
進歩性(IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-8	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-8	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

- 文献1: WO 00/06754 A2(CENTRUMVOOR PLANTENVEREDEKINGS-EN REPRODUCTIEONDERZOEK)  
2000.02.10
- 文献2: WO 00/06753 A1(CENTRUMVOOR PLANTENVEREDEKINGS-EN REPRODUCTIEONDERZOEK )  
2000.02.10
- 文献3: van der Vossen EA, et.al., Plant J. (2000), Vol. 23, No. 5, p. 567-576
- 文献4: Bendahmane A, et.al., Plant Cell(1999), Vol. 11, No. 5, p. 781-792
- 文献5: WO 99/54490 A2(PLANT BIOSCIENCE LIMITED)1999.10.28
- 文献6: WO 01/29239 A2(PLANT BIOSCIENCE LIMITED)2001.04.26

## 【請求の範囲1について】

請求の範囲1に係る発明は、国際調査報告で引用された文献1-3より新規性を有さない。  
文献1-3には、本願配列番号1の塩基配列と78%の相同性を有するジャガイモより単離したセンチュウ抵抗性遺伝子が記載されている。

## 【請求の範囲1について】

請求の範囲1に係る発明は、文献4-6より新規性を有さない。  
文献4-6には、本願配列番号1の塩基配列と78%の相同性を有するウイルス抵抗性遺伝子が記載されている。

## 【請求の範囲2-8について】

請求の範囲2-8に係る発明は、文献1-3により進歩性を有さない。  
本願優先日当時、公知のDNAをベクターに組み込むこと、そのベクターを宿主細胞に組み込んで形質転換すること、形質転換植物を作成することは、当該分野における周知技術であると認められるから、文献1-3に記載されるセンチュウ耐性遺伝子を導入したベクターを作製すること、該ベクターを植物宿主細胞に形質転換することは容易になし得るものであると認める。